



01.03408
Avant. 5/2001
C

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

26 DEC. 2001

Fait à Paris, le

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04
Télécopie : 33 (1) 42 93 59 30
www.inpi.fr

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI


 N° 11354*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

QB 540 W /2-6599

| | | | |
|--|--|---|--|
| REMISE DES PIÈCES DATE LIEU | | Réservé à l'INPI 13 MARS 2001 75 INPI PARIS | |
| N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI | | 0103408 | |
| DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI | | 13 MARS 2001 | |
| Vos références pour ce dossier (facultatif) | | B 00/4120 FR LM | |
| Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie 2 NATURE DE LA DEMANDE <input checked="" type="checkbox"/> Cochez l'une des 4 cases suivantes Demande de brevet <input checked="" type="checkbox"/> Demande de certificat d'utilité <input type="checkbox"/> Demande divisionnaire <input type="checkbox"/> Demande de brevet initiale <input type="checkbox"/> N° _____ Date / / ou demande de certificat d'utilité initiale <input type="checkbox"/> N° _____ Date / / Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale <input type="checkbox"/> N° _____ Date / / | | | |
| 3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Composés dérivés des oxindoles et leur application thérapeutique en cancérologie. | | | |
| 4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE | | Pays ou organisation Date / / N° | |
| | | Pays ou organisation Date / / N° | |
| | | Pays ou organisation Date / / N° | |
| | | <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite» | |
| 5 DEMANDEUR Nom ou dénomination sociale Prénoms Forme juridique N° SIREN Code APE-NAF | | <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite» | |
| Adresse Rue Code postal et ville | | 20 avenue Raymond Aron 92160 ANTONY | |
| Pays | | FRANCE | |
| Nationalité | | Française | |
| N° de téléphone (facultatif) | | | |
| N° de télécopie (facultatif) | | | |
| Adresse électronique (facultatif) | | | |

**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

| | |
|------------------------------|-----------------|
| REMISE DES PIÈCES | Réervé à l'INPI |
| DATE | 13 MARS 2001 |
| LIEU | 75 INPI PARIS |
| N° D'ENREGISTREMENT | |
| NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI | 0103408 |

DB 540 W /190600

| | | |
|---|--|--|
| Vos références pour ce dossier : (facultatif) | | B 00/4120 FR |
| <p>6 MANDATAIRE</p> <p>Nom Prénom Cabinet ou Société</p> <p>N °de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel</p> <p>Adresse Rue Code postal et ville</p> <p>N° de téléphone (facultatif) N° de télécopie (facultatif) Adresse électronique (facultatif)</p> <p>BUREAU D.A. CASALONGA-JOSSE 8, Avenue Percier 75008 PARIS</p> | | |
| <p>7 INVENTEUR (S)</p> <p>Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée</p> | | |
| <p>8 RAPPORT DE RECHERCHE</p> <p>Établissement immédiat ou établissement différé <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p> <p>Paiement échelonné de la redevance Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non</p> | | |
| <p>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</p> <p>Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (<i>joindre un avis de non-imposition</i>) <input type="checkbox"/> Requise antérieurement à ce dépôt (<i>joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence</i>):</p> | | |
| <p>Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes</p> | | |
| <p>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</p> <p><i>A. Casalonga</i> A. CASALONGA (bm 92-1044i) Conseil en Propriété Industrielle</p> | | <p>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</p> <p><i>C. Tran</i> C. TRAN</p> |

**Composés dérivés des oxindoles
et leur application thérapeutique en cancérologie**

La présente invention concerne des composés dérivés des oxindoles, leur utilisation pour inhiber la vascularisation d'une masse tumorale et/ou leur application thérapeutique pour la préparation d'un médicament ayant une propriété pharmacologique antivasculaire.

Les étapes essentielles du cycle cellulaire d'un eucaryote se décomposent de la façon suivante :

Après la phase M, qui se compose d'une division nucléaire (mitose) et d'une division cytoplasmique (cytodiérèse), les cellules filles commencent l'interphase d'un nouveau cycle. Cette interphase commence avec la phase G1 pendant laquelle on note une reprise accrue des activités de biosynthèse de la cellule. La phase S commence quand la synthèse de l'ADN démarre et se termine quand les chromosomes se sont répliqués (chaque chromosome est alors composé de deux chromatides sœurs identiques). La cellule entre ensuite en phase G2 (dernière phase de l'interphase) qui se poursuit jusqu'au début de la mitose, initiant la phase M. La division cellulaire comporte ainsi la division des chromosomes (ou mitose) et la division du cytoplasme (ou cytodiérèse).

Le processus de mitose comprend plusieurs phases :

- la prophase caractérisée par la condensation de l'ADN et la duplication dans le noyau encore intact des chromosomes en deux chromatides unies par un centromère.,
- la métaphase où l'on observe la dissolution de la membrane du noyau et la formation d'un faisceau de microtubules et protéines, le fuseau mitotique, sur lequel les chromosomes se placent en position équatoriale pour former la plaque métaphasique,
- l'anaphase qui consiste en la séparation et la migration des chromatides de part et d'autre du noyau vers les pôles du fuseau mitotique en s'attachant aux microtubules à l'aide d'une structure appelée kinétochore,
- la télophase : lors de cette étape, les chromosomes reprennent la forme de deux réseaux de chromatine fine diffuse, l'enveloppe nucléaire se reforme, puis la membrane cytoplasmique, et un nouveau réseau de microtubules apparaît dans le cytoplasme.

Les microtubules sont des fibres microscopiques qui font partie du cytosquelette cellulaire et jouent un rôle crucial dans la division, le transport et la mobilité de la cellule. Les microtubules sont composés de tubuline, une protéine hétérodimérique qui polymérise pour former de façon réversible les microtubules qui, 5 eux-mêmes s'assemblent pour composer le fuseau mitotique lors de la métaphase.

De par sa fonction dans la cellule, la tubuline représente ainsi une cible de choix pour des composés antimitotiques à visée antitumorale.

Il est maintenant bien établi que le développement d'une vascularisation 10 intra ou périumorale est un événement clé autant pour la croissance d'une tumeur que pour la dissémination métastatique par voie sanguine. Un vaisseau sanguin nourrit en effet des millions de cellules. Ainsi, il est primordial dans une approche anticancéreuse de limiter l'apport sanguin au site de la tumeur.

L'angiogenèse est un mécanisme de néovascularisation qui prend naissance à 15 partir d'un réseau capillaire existant. On peut soit empêcher la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans la tumeur (antiangiogenèse) soit envisager une destruction des vaisseaux existants dans le but de limiter l'approvisionnement en nutriments de la tumeur (approche antivasculaire).

Dans l'approche antiangiogénique qui est une approche cytostatique, les 20 facteurs angiogéniques généralement synthétisés par les tumeurs comme le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), le PD-ECGF (Platelet Derived Endothelial Cell Growth Factor) ou le b-FGF (Facteur de Croissance basique des Fibroblastes) sont bloqués. La croissance de nouveaux vaisseaux peut également être inhibée avec des molécules antiangiogeniques tels que les inhibiteurs du récepteur 25 tyrosine kinase KDR, des anticorps anti-intégrines, ou par des polypeptides anti-angiogéniques naturels comme l'angiostatine ou l'endostatine.

Au contraire, l'approche antivasculaire induit des effets cytotoxiques. La colchicine, le colcémide, et le nocadazole inhibent la polymérisation de la tubuline. La vinblastine et la vincristine, à faibles concentrations, inhibent également la polymérisation, mais en interagissant à un site distinct du précédent, à concentration plus élevée, ces deux dernières molécules peuvent agréger la tubuline. Le taxol, au contraire, stimule l'assemblage de la tubuline en microtubules et stabilise les microtubules pré-formés.

Tous ces composés cependant, qu'ils polymérisent la tubuline ou qu'ils 35 dépolymérisent les microtubules ont un même effet antimitotique donc cytotoxique vis-

5 à-vis des cellules endothéliales et tumorales. Certains composés inhibiteurs de la polymérisation des microtubules tels que la colchicine, la vincristine ou la vinblastine ont de plus été caractérisés pour leur activité anti-vasculaire c'est-à-dire qu'ils induisent en quelques heures un arrêt du flux sanguin dans la tumeur et une nécrose hémorragique dans des modèles expérimentaux de tumeur.

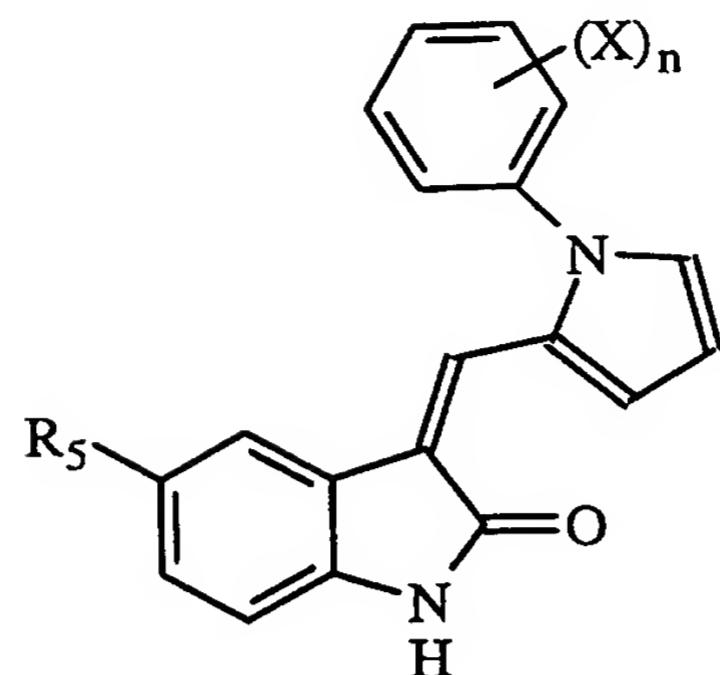
10 Beaucoup de ces composés capables de se fixer à la tubuline comme la combrestatine A4 ou les analogues de taxol sont insolubles dans l'eau. La demande de brevet W0/48606 décrit une méthode qui par le biais d'une phosphorylation, permet la solubilisation de la combrétastatine A4 dans l'eau. Ce composé phosphorylé est sous forme de prodrogue (c'est-à-dire inactive) mais est capable de devenir active *in vivo* sous l'action de phosphatases non spécifiques et ainsi, de stopper le cycle cellulaire en phase G2/M.

15 La demande de brevet WO96/40116 décrit ces dérivés d'oxindoles pour moduler le signal de transduction de la protéine tyrosine kinase (PTK).

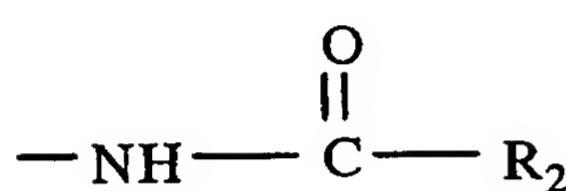
20 La demanderesse a découvert une famille de composés chimiques dérivés des oxindoles ou indolin-2-ones ayant une action d'inhibition de polymérisation de tubuline, un effet cytotoxique sur des cellules épithéliales tumorales et une action sur le détachement cellulaire. On entend par "détachement cellulaire" le détachement des cellules endothéliales des vaisseaux qui vont entraîner une désorganisation de ces vaisseaux et, par conséquent, une stase du flux sanguin et nécrose subséquente de la tumeur par non approvisionnement essentiellement en facteurs de croissance et en oxygène.

25 L'objet de l'invention est l'utilisation de composés dérivés de l'indolin-2-one pour inhiber la polymérisation de la tubuline, ce qui a pour conséquence d'interrompre le cycle cellulaire en phase G2/M. Grâce à l'action antimitotique donc cytotoxique de l'invention, ces composés pourront exercer un effet antitumorale. En outre, de part leur mécanisme d'action –inhibition de la polymérisation de la tubuline- pourront exercer un effet antivasculaire sur les tumeurs.

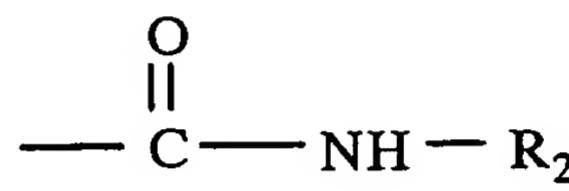
30 La présente invention a ainsi pour objet les composés de la formule (I)



dans laquelle R₅ est choisi parmi les groupements :



ou



5

dans laquelle R₂ est un groupement alkyle en C1-C3

dans laquelle X peut être Cl, Br, ou F

dans laquelle n est compris entre 1 et 3, sous la forme E, Z, ou un mélange des deux formes d'isomères.

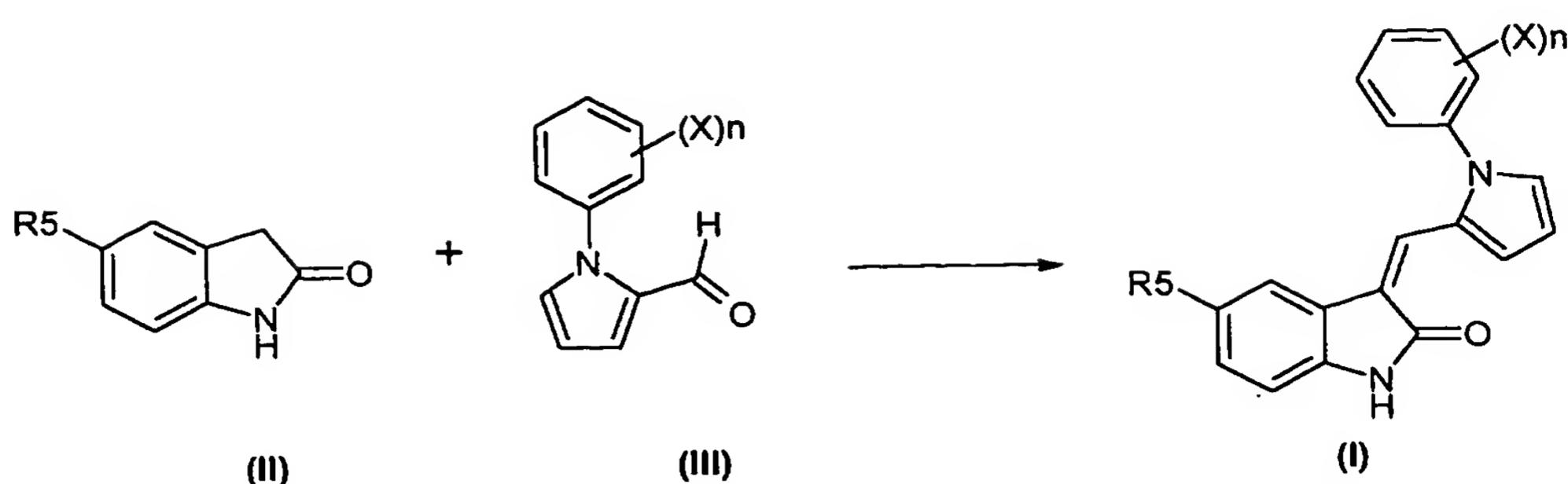
10 Dans les composés de la formule (I), R₂ désigne préférentiellement un groupement méthyle, X est préférentiellement chlore, n est de préférence égal à 2.

La présente invention a tout particulièrement pour objet les composés de la formule (I) telle que définie ci-dessus, répondant aux formules suivantes :

3-[N-(3,5-dichlorophényl)-pyrrol-2-yl]-5-acétylamino-indolin-2-one

15 3-[N-(3-chlorophényl)-pyrrol-2-yl]-5-acétylamino-indolin-2-one

Les produits de formule générale (I), dans lesquels R₅, et X et n sont décrits comme précédemment, peuvent être obtenus par couplage d'une indolin-2-one de formule générale (II), dans laquelle R₅ est décrit comme précédemment, avec un N- phényl-pyrrol-2-carboxaldéhyde de formule générale (III), dans lequel X et n sont décrits comme précédemment, selon le schéma ci-dessous :



La réaction de couplage s'effectue généralement dans les conditions décrites par E. Knoevenagel (Chem. Ber. 1900, 23, 172), à savoir dans un solvant protique comme le méthanol ou l'éthanol, en présence d'une quantité catalytique de base organique telle que la pipéridine, à une température comprise entre 20° et la température de reflux du solvant utilisé.

Les indolin-2-ones de formule générale (II) et les N-phényl-pyrrol-2-carboxaldehyde de formule (III), dans lesquels respectivement R5, X et n sont décrits comme précédemment, sont soit commerciaux soit préparés selon les conditions décrites dans la littérature.

Les composés de la présente invention tels que définis ci-dessus possèdent des propriétés antimitotiques par inhibition de la polymérisation de tubuline en microtubules qui sont des composants clés dans l'établissement du fuseau mitotique lors de la division cellulaire. Ainsi, les molécules interférant avec la polymérisation de la tubuline sont susceptibles de limiter les proliférations cellulaires inopportunnes telles que celles observées dans les cancers.

Les composés de la présente invention possèdent en plus de leurs propriétés inhibitrices spécifiques de la tubuline, des effets cellulaires tels que des propriétés antiprolifératives et antivasculaires. Les composés de la présente invention sont notamment utiles dans le cadre de thérapie de tumeurs primaires de cancers.

Ces propriétés justifient leur application en thérapeutique et l'invention a particulièrement pour objet à titre de médicaments, les produits de la formule (I) telle que définie ci-dessus dans un milieu pharmaceutiquement acceptable.

Ces compositions pharmaceutiques peuvent être administrées par voie buccale, par voie parentérale ou par voie locale en application topique sur la peau et les muqueuses ou par injection par voie intraveineuse ou intramusculaire. Ces compositions peuvent être solides ou liquides et se présenter sous toutes les formes pharmaceutiques couramment utilisées en médecine humaine comme, par exemple, les

comprimés simples ou dragéifiés, les pilules, les tablettes, les gélules, les gouttes, les granulés, les préparations injectables, les pommades, les crèmes ou les gels. Elles sont préparées selon les méthodes usuelles. Le principe actif peut y être incorporé à des excipients habituellement employés dans ces compositions pharmaceutiques, tels que le talc, la gomme arabique, le lactose, l'amidon, le stéarate de magnésium, le beurre de cacao, les véhicules aqueux ou non, les corps gras d'origine animale ou végétale, les dérivés paraffiniques, les glycols, les divers agents mouillants, dispersants, ou émulsifiants, les conservateurs.

La posologie usuelle, variable selon le produit utilisé et le sujet traité peut être, par exemple, de 0,05 à 5 grammes par jour chez l'adulte.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans toutefois la limiter :

15 Exemple 1 : 3-[N-(3,5-dichlorophényl)-pyrrol-2-yl]-5-acétylamino-indolin-2-one

A une solution de 2,12 g (11 mmoles) de 5-acétylamino-indolin-2-one dans 220 mL d'éthanol contenant 0,5 mL de pipéridine, on ajoute 2,68 g (11 mmoles) de 3-[N-(3,5-dichlorophényl)-pyrrole-2-carboxaldéhyde. Le milieu réactionnel est porté au reflux pendant 3 heures. Après refroidissement, le précipité formé est essoré, lavé par 2 fois 5 mL d'éthanol glacé et séché sous pression réduite. On obtient ainsi 1,81 g (40%) de 3-[N-(3,5-dichlorophényl)-pyrrol-2-yl]-5-acétylamino-indolin-2-one, sous forme d'un solide jaune dont la caractéristique est la suivante : point de fusion = 267°C.

25 Exemple 2 : 3-[N-(3-chlorophényl)-pyrrol-2-yl]-5-acétylamino-indolin-2-one

En opérant comme à l'exemple 1, mais à partir de 1,05 g (5 mmoles) de 5-acétylamino-indolin-2-one dans 150 mL d'éthanol et de 0,95 g (10 mmoles) de 3-[N-(3-chlorophényl)-pyrrole-2-carboxaldéhyde, on obtient 0,32 g (17%) de 3-[N-(3-chlorophényl)-pyrrol-2-yl]-5-acétylamino-indolin-2-one, sous forme d'un solide orange dont la caractéristique est la suivante : point de fusion = 251°C.

Exemple 3 : synthèse en parallèle de 3-(aryl)méthylène-indolin-2-one de formule générale (I)

Dans un réacteur magnétique chauffant avec condenseur Zymark, de type STEM RS2050 contenant 25 puits en parallèle munis chacun d'un tube en verre de 50

mL, on introduit 0,5 mmole d'indolyl-2-one de formule générale (II), 0,5 mmole d'un aldéhyde aromatique de formule générale (III), 5 mL d'éthanol et 1 goutte de pipéridine. Le milieu réactionnel est porté au reflux pendant une nuit. Après refroidissement, et dilution avec 5 mL d'eau, le précipité formé est essoré et séché sous pression réduite. On obtient ainsi les 3-(aryl)méthylène-indolin-2-ones de formule générale (I), qui peuvent être représentées, à titre non limitatif par le 3-[N-(3,5-dichlorophényl)-pyrrol-2-yl]-indolin-2-one-5-yl-N-méthylcarboxamide (exemple 3-1).

Exemple 4 : Evaluation de l'inhibition de polymérisation de la tubuline

10 La tubuline est purifiée à partir de cerveaux de porc (Shelanski *et al.*, 1973, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 765-768. Weingarten *et al.*, 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 1858-1862). Brièvement, les cerveaux sont broyés et centrifugés dans un tampon d'extraction. La tubuline présente dans le surnageant de l'extrait subit deux cycles successifs de polymérisation à 37°C et dépolymérisation à 4°C, avant d'être

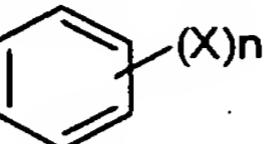
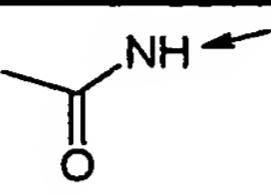
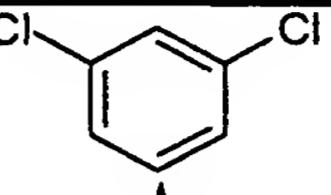
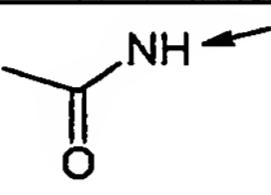
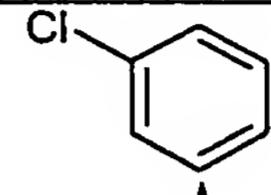
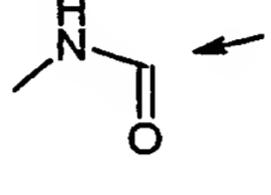
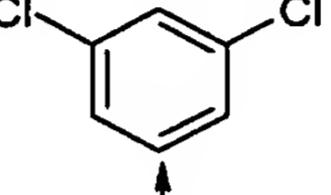
15 séparée des MAPs (Microtubule Associated Proteins) par chromatographie sur colonne de phosphocellulose P11 (Whatman). La tubuline ainsi isolée est pure à plus de 95 %. Elle est conservée dans un tampon nommé RB/2 30%glycérol de composition MES-NaOH [2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid] 50mM, pH6.8 ; MgCl₂ 0.25mM ; EGTA 0.5mM ; glycérol 30 % (v/v), GTP (guanosine-5'-tri-phosphate) 0.2mM.

20 La polymérisation de la tubuline en microtubules est suivie par turbidimétrie : la tubuline est ajustée à une concentration de 10µM dans le tampon RB/2 30 % glycérol auquel on ajoute 1mM GTP et 6mM MgCl₂. La polymérisation est déclenchée par une augmentation de la température de 6°C à 37°C dans une cuve de 1cm de trajet optique, placée dans un spectrophotomètre UVIKON 931 (Kontron) équipé d'un porte-cuve thermostaté. L'augmentation de la turbidité de la solution est suivie à 350nm.

25 Les produits à tester sont mis en solution à 10mM dans le DMSO et ajoutés à des concentrations variables (0.5 à 10µM) à la solution de tubuline avant polymérisation. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la polymérisation par rapport aux contrôles.

30 La CI₅₀ est définie comme la concentration de produit qui inhibe de 50 % la vitesse de polymérisation de la tubuline.

Mesure de l'inhibition de la polymérisation de la tubuline en fonction des composés de formule (I)

| Exemple | R5 |  | Inhibition de polymérisation de tubuline $CI_{50} \mu M$ |
|---------|---|---|---|
| 1 |  |  | 2.4 |
| 2 |  |  | 10 |
| 3-1 |  |  | 3.3 |

On considère comme très actif un produit dont la CI_{50} est inférieure ou égale à $3 \mu M$.

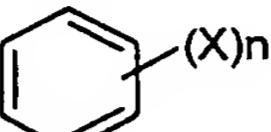
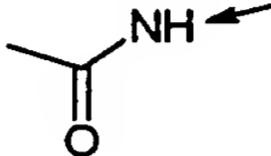
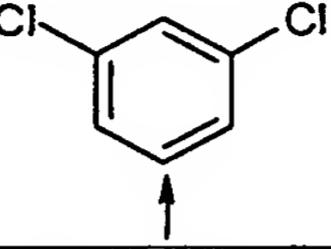
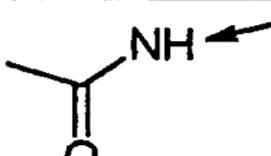
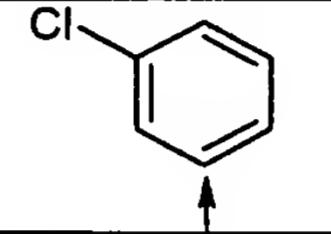
Sur les trois composés testés, ceux portant deux résidus chlore semblent plus actifs.

Exemple 5 : Evaluation de l'inhibition de prolifération de cellules HeLa

On évalue la prolifération des cellules HeLa en mesurant l'incorporation de $[^{14}C]$ -thymidine de la façon suivante. Les cellules HeLa (cellules épithéliales tumorales d'origine humaine) sont cultivées dans un milieu DMEM (Gibco) qui contient 10 % de sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur et des antibiotiques (pénicilline 1 %, streptomycine 1 %). Pour effectuer le test de prolifération, on ensemence les cellules dans des microplaques cytostar 96 puits (Amersham), à raison de 5000 cellules par puits. On ajoute ensuite la $[^{14}C]$ -thymidine ($0.1 \mu Ci/puits$) et les composés à évaluer à des concentrations variant jusqu'à $10 \mu M$; le DMSO utilisé pour solubiliser les composés ne doit pas excéder 0.5 % dans le milieu. 48h après incubation à $37^\circ C$, on mesure la radioactivité incorporée dans les cellules par comptage de la plaque dans un compteur TRI-LUX (Wallac). Les résultats sont exprimés en % de coups incorporés dans les cellules en présence de composés par rapport au témoin de prolifération.

La CI_{50} est définie comme la concentration de produit qui diminue de 50 % la radioactivité par rapport à un contrôle non traité.

Mesure de l'inhibition de prolifération de cellules HeLa en présence de composés de formule (I)

| Exemple | R5 |  | Inhibition de prolifération de cellules HeLa $IC_{50} \mu M$ |
|---------|---|---|--|
| 1 |  |  | 0.05 |
| 2 |  |  | 2.3 |

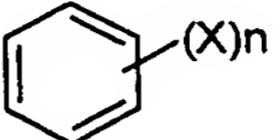
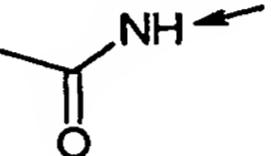
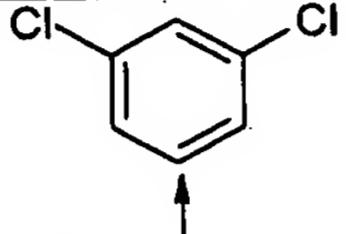
On considère qu'un produit dont la IC_{50} est inférieure à $1 \mu M$ est cytotoxique

5 Parmi les deux composés testés, le composé 1 présente des caractéristiques intéressantes en ce qui concerne l'inhibition de la prolifération cellulaire.

Exemple 6 : Evaluation de l'effet de détachement de cellules endothéliales HDMEC

10 L'évaluation du détachement des cellules endothéliales *in vitro* est déterminée de la façon suivante. Les cellules HDMEC (Human Dermal Microvascular Endothelial Cells, Promocell, c-122102) sont cultivées dans un milieu ECGM-MV qui contient 5 % de sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur, des facteurs de croissance (EGF 10 ng/mL, hydrocortisone 1 $\mu g/mL$, 0.4 % supplément de croissance avec héparine) et des antibiotiques (amphotéricine 50 ng/mL et gentamicine 50 $\mu g/mL$). Pour le test de détachement, les HDMEC sont ensemencées à 5000 cellules par puits dans des plaques 15 96 puits à fond clair (Costar) pré-adsorbées avec de la fibronectine (10 $\mu g/mL$) ou de la vitronectine (1 $\mu g/mL$) ou de la gélatine. Vingt-quatre heures plus tard, le milieu de culture est remplacé par du milieu ECGM-MV 0.1 % BSA (sérum albumine bovine) contenant les produits indiqués. Les concentrations testées sont 0,1-0,3 et 1 μM pour 20 chaque produit. Après deux heures de traitement, les cellules sont marquées pendant une heure à la calcéine (1.6 $\mu g/mL$, Molecular Probes) dans du milieu ECGM-MV 0.1 % BSA. Les cellules détachées sont ensuite enlevées par lavage avec du milieu ECGM-MV 0.1 % BSA; 100 μl de milieu est ajouté à chaque puits. La fluorescence des 25 cellules qui restent attachées au substratum du puits est comptée à l'aide d'un fluorimètre, Spectrafluor Plus (Tecan, excitation 485 nm, et émission 535 nm). Les

données sont la moyenne de six échantillons différents et sont exprimées en pourcentage du contrôle (cellules non traitées).

| Exemple | R5 |  | Pourcentage de détachement de cellules HDMEC induit par 1 µM de composé |
|---------|---|---|---|
| 1 |  |  | 29 % |

5

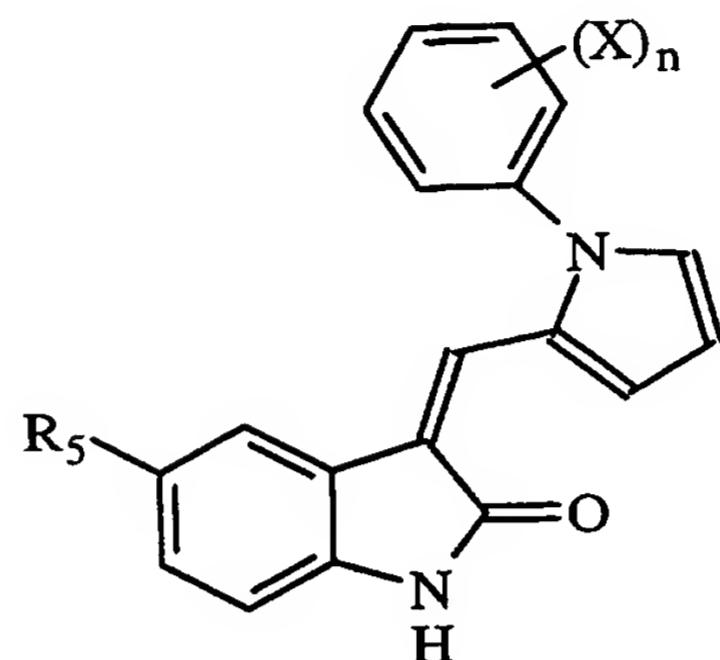
Un effet de détachement cellulaire supérieur ou égal à 15 % est considéré comme significatif.

Le produit 1 a donc, en plus de propriétés d'inhibition de la tubuline et d'inhibition de la prolifération cellulaire des cellules HeLa testées, une action marquée sur le détachement de cellules endothéliales.

10

REVENDICATIONS

1. Composé de formule (I)



dans laquelle R_5 est choisi parmi les groupements :

5



dans laquelle R_2 est un groupement alkyle en C1-C3

dans laquelle X peut être Cl, Br, ou F

10 dans laquelle n est compris entre 1 et 3, sous la forme E, Z, ou un mélange des deux formes d'isomères.

2. Composé selon la revendication 1 caractérisé par le fait que R_2 est un groupement méthyle.

15

3. Composé selon la revendication 1 ou 2 caractérisé par le fait que X est Cl.

4. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisé par le fait que n est égal à 2.

20

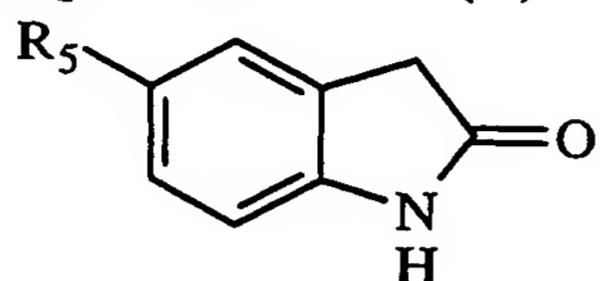
5. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 caractérisé par le fait qu'il est choisi parmi :

3-[N-(3,5-dichlorophényl)-pyrrol-2-yl]-5-acétylamino-indolin-2-one

3-[N-(3-chlorophényl)-pyrrol-2-yl]-5-acétylamino-indolin-2-one

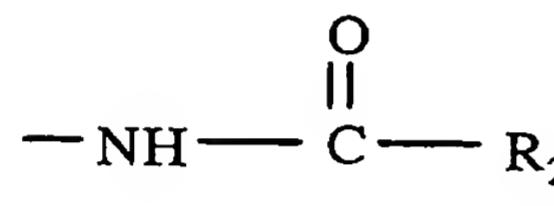
3-[N-(3,5-dichlorophényl)-pyrrol-2-yl]-indolin-2-one-5-yl-N-méthylcarboxamide.

6. Procédé de préparation des composés de formule (I) caractérisé par le fait que l'on soumet le composé de formule (II)

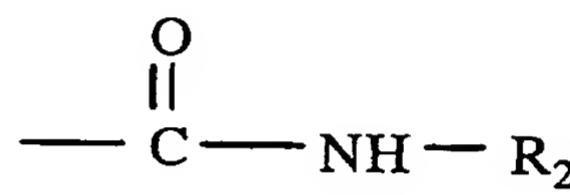


5

dans laquelle R₅ est choisi parmi les groupements :



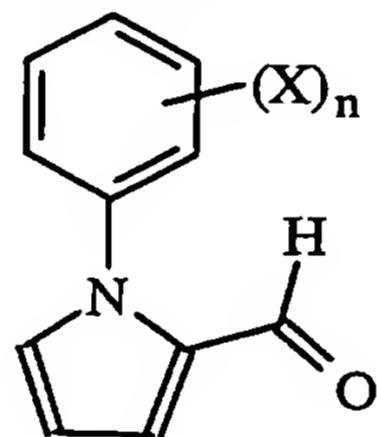
ou



dans laquelle R₂ est un groupement alkyle en C₁-C₃

10

à une réaction avec un composé de formule (III)



dans laquelle X peut être Cl, Br, ou F

dans laquelle n est compris entre 1 et 3.

15

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé par le fait que la réaction s'effectue en présence de pipéridine et d'éthanol au reflux.

20

8. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 pour son application comme médicament.

9. Composition pharmaceutique caractérisée par le fait qu'elle comprend dans un milieu pharmaceutiquement acceptable, un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.

25

- 10. Médicament caractérisé par le fait qu'il contient au moins un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 pour son application thérapeutique dans le traitement des tumeurs primaires de cancers.
- 5 11. Médicament selon la revendication 9 pour son application dans le traitement du cancer par action inhibitrice sur la polymérisation de la tubuline en microtubules.
- 10 12. Médicament selon la revendication 9 pour son application dans le traitement du cancer par action inhibitrice de la prolifération cellulaire.
- 13. Médicament selon la revendication 9 pour son application dans le traitement du cancer par action de détachement de cellules endothéliales.
- 15 14. Médicament selon la revendication 9 pour son application dans le traitement du cancer par action antivasculaire.
- 15. Utilisation d'un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du cancer.

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° .1 / .1.

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W /260899

| | | | |
|--|----------------------|-----------------------------------|--------------------|
| Vos références pour ce dossier (facultatif) | | B 00/4120 FR | |
| N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL | | <i>0103408</i> | |
| TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) | | | |
| Composés dérivés des oxindoles et leur application thérapeutique en cancérologie. | | | |
| LE(S) DEMANDEUR(S) : | | | |
| Société Anonyme dite : AVENTIS PHARMA S.A. | | | |
| DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages). | | | |
| Nom | | COMBEAU | |
| Prénoms | | Cécile | |
| Adresse | Rue | 2013 Avenue Roger Salengro | |
| | Code postal et ville | 92370 | CHAVILLE |
| Société d'appartenance (facultatif) | | | |
| Nom | | MAILLIET | |
| Prénoms | | Patrick | |
| Adresse | Rue | 87 rue Dalayrac | |
| | Code postal et ville | 94120 | FONTENAY SOUS BOIS |
| Société d'appartenance (facultatif) | | | |
| Nom | | CHIRON épouse BLONDEL | |
| Prénoms | | Marielle | |
| Adresse | Rue | 13 rue Castagnary | |
| | Code postal et ville | 75015 | PARIS |
| Société d'appartenance (facultatif) | | | |
| DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) | | Paris, le 13 Mars 2001. | |
| | | <i>A. Casalonga</i> | |
| | | (bm 92-1044i) | |
| | | Conseil en Propriété Industrielle | |

